

Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz

Patent number: DE10046184
Publication date: 2002-04-04
Inventor: SCHUELEIN JUERGEN (DE); KOSAK HANS (DE)
Applicant: NOVEMBER AG MOLEKULARE MEDIZIN (DE)
Classification:
- **International:** C12Q1/68
- **European:** C12Q1/68B10
Application number: DE20001046184 20000918
Priority number(s): DE20001046184 20000918

Also published as:

WO0224944 (A3)
WO0224944 (A2)

Report a data error here

Abstract of DE10046184

The invention relates to a kit for carrying out a method, containing: a) bond sequences immobilised on a support and b) bonds respectively formed from one first primer that is specific to the nucleic acids to be detected and one identification sequence specific to the first primer, whereby the identification sequence is selected from a group of identification sequences that do not cross-hybridise in predetermined uniform hybridisation conditions.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 46 184 A 1

51 Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 100 46 184.0
22 Anmeldetag: 18. 9. 2000
43 Offenlegungstag: 4. 4. 2002

71 Anmelder:

november Aktiengesellschaft Gesellschaft für
Molekulare Medizin, 91056 Erlangen, DE

74 Vertreter:

Gaßner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

72 Erfinder:

Schüle, Jürgen, 91054 Erlangen, DE; Kosak, Hans,
Dr., 53123 Bonn, DE

56 Entgegenhaltungen:

US 60 90 553 A
US 58 30 655 A
US 57 44 311 A
US 56 77 439 A
US 55 25 494 A

Datenbank BIOTECHABS bei STN, AN 1993-05050
zu:

The production of PCR products with 5' single-
stranded tails using primers that incorporate
novel phosphoramidite, oligonucleotide synthesis
for generation of polymerase chain reaction DNA
primer with non-amplifiable tail and application
to disease diagnosis. NEWTON, C.R., u.a., Nucleic
Acid Res., (1993)21,5,1155-62 [rech. am 18.05.01];

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis min-
destens einer Nukleinsäuresequenz 16 mittels einer einen
Gegenstrang zu der Nukleinsäuresequenz 16 erzeugen-
den Reaktion mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen einer Verbindung 14, gebildet aus einem
für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16 spezifi-
schen ersten Primer 10 und einer für den ersten Primer 10
spezifischen Identifizierungssequenz 12, wobei in der Ver-
bindung 14 ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Re-
aktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizie-
rungssequenz 12 verhindert,

b) Inkontaktbringen der Verbindung 14 mit der nachzu-
weisenden Nukleinsäuresequenz 16 und einem zweiten
für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16 spezifi-
schen Primer 18,

c) Durchführen der Reaktion, wobei sowohl der zweite Pri-
mer (18) als auch die Verbindung 14 mittels einer Polyme-
rase-Reaktion modifiziert werden, so daß ein spezifisches
Produkt gebildet wird, bestehend aus einem doppelsträn-
gigen Bereich und der einzelsträngigen Identifizierungs-
sequenz 12,

d) Inkontaktbringen der modifizierten Verbindung 14 mit
einer zu der Identifizierungssequenz 12 zumindest teilwei-
se komplementären an einem Träger 22 immobilisierten
Bindungssequenz 26, wobei die Identifizierungssequenz
12 spezifisch mit der Bindungssequenz 26 hybridisiert
und

e) Nachweis der Hybridisierung der modifizierten Verbin-
dung 14 mit der Bindungssequenz 26.

DE 100 46 184 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz, eine Verwendung und einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0002] Zum Nachweis einer Nukleinsäuresequenz ist es allgemein bekannt, die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer DNA-Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu vervielfältigen. Die vervielfältigten Sequenzen können dann mittels einer Hybridisierung mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen Bindungssequenz nachgewiesen werden. Bei diesem Verfahren ist es nachteilig, daß für jede nachzuweisende Nukleinsäuresequenz eine spezifische Bindungssequenz erforderlich ist. Weiterhin ist es von Nachteil, daß für jede Hybridisierung mit dieser Bindungssequenz spezifische Hybridisierungsbedingungen eingehalten werden müssen.

[0003] Aus Whitcombe, D. et al., Nature Biotechnology 17 (1999) Seiten 804 bis 807 ist es bekannt, eine PCR mit einem speziellen Primer durchzuführen. Der Primer weist einen Bereich auf, in dem die Synthese eines Gegenstrangs durch ein Blockiermittel für eine Polymerase verhindert wird. Der Bereich weist ein Fluorophor und einen Quencher auf, welche sich durch Basenpaarungen in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Ein Fluoreszenz-Signal kann nicht erzeugt werden. Der Bereich weist in einem nicht basengepaarten Abschnitt eine Sequenz auf, die komplementär zu einem durch die Verlängerung des Primers bei der PCR entstehenden Produkt ist. Nach einer Denaturierung des Produkts, kommt es unter geeigneten Bedingungen zu einer Basenpaarung des Abschnitts mit dem komplementären Bereich in dem Produkt. Dadurch wird der Quencher von dem Fluorophor getrennt, so daß ein Fluoreszenz-Signal entstehen kann. Das Fluoreszenz-Signals dient als Nachweis für das Vorhandensein einer für den Primer spezifischen DNA-Sequenz. Bei dem Verfahren ist es nachteilig, daß ein für jede nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischer Primer mit einem spezifischen komplementären Abschnitt synthetisiert werden muß. Durch die verschiedenen funktionellen Einheiten ist der Primer verhältnismäßig lang und damit aufwendig herzustellen.

[0004] Aus der EP 0 401 037 ist es bekannt bei einer PCR Nukleotide einzusetzen, die in der zu vervielfältigenden Nukleinsäuresequenz nicht vorkommen. Ein solches Nukleotid kann Desoxy-Uridin sein. Nach einer Vervielfältigungsreaktion kann ein unerwünschtes Produkt mit Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden. Uracil-DNA-Glycosylase spaltet die glycosidische Bindung zwischen der Base Uracil und dem Zucker Desoxy-Ribose eines in einem DNA-Molekül eingebauten Desoxy-Uridin-Rests. Dadurch kann das unerwünschte Produkt bei einer weiteren Vervielfältigungsreaktion nicht mehr als Matrize dienen. Ein weiteres einsetzbares Nukleotid ist Bromdesoxy-Uridin. Bromdesoxy-Uridin enthaltende DNA kann durch Behandlung mit Licht unter geeigneten Bedingungen abgebaut werden.

[0005] Aus der US 5,744,311 ist ein auf einer Strangverdrängung basierendes Vervielfältigungsverfahren für Nukleinsäuren bekannt. Dabei wird ein Primer mit dem 3'-Ende einer zu vervielfältigenden einzelsträngigen Nukleinsäure hybridisiert und mittels einer DNA-Polymerase verlängert. Zum Verlängern werden Desoxy-Nukleosidtriphosphate verwendet, die zum Teil derivatisiert sind. Geeignete derivatisierte Desoxy-Nukleosidtriphosphate sind z.B. α -Thio-Desoxy-Nukleosidtriphosphate. Ein Strang der entstandenen doppelsträngigen DNA mit derivatisierten Desoxy-Nukleotid-Resten wird an bestimmten Stellen von einer Restriktionsendonuklease erkannt und geschnitten. Aus-

gehend von dem Schnitt verlängert die DNA-Polymerase das 3'-Ende des geschnittenen DNA-Strangs. Der andere Teil des geschnittenen DNA-Strangs wird von der doppelsträngigen DNA verdrängt. Durch Wiederholen des Verfahrens wird der verdrängte DNA-Strang vervielfältigt.

[0006] Aus der WO 97/31256 ist es bekannt, Zielsequenzen in Nukleinsäuren mittels einer Ligase-Reaktion und einer immobilisierten Bindungssequenzen aufweisenden adressierbaren Matrix nachzuweisen. Dabei wird für jede nachzuweisende Zielsequenz eine Oligonukleotid-Sonde verwendet, die einen Zielsequenzspezifischen und einen Bindungssequenz-spezifischen Anteil aufweist. Ferner wird eine Markierungssubstanz aufweisende zweite Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die an der nachzuweisenden Zielsequenz in unmittelbarer Nachbarschaft zu der ersten Oligonukleotid-Sonde binden kann. Beim Vorhandensein der Zielsequenz binden die erste und die zweite Oligonukleotid-Sonde an der Zielsequenz. Sie werden durch eine Ligase kovalent miteinander verbunden. Die verbundenen Oligonukleotid-Sonden werden mit den immobilisierten Bindungssequenzen in Kontakt gebracht, so daß eine Hybridisierung stattfindet. Das Vorhandensein der Zielsequenz wird durch das Detektieren der Markierungssubstanz am Ort der Hybridisierung nachgewiesen. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß es häufig falsch-positive Ergebnisse liefert.

[0007] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollen ein Verfahren, eine Verwendung und ein Kit zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz angegeben werden.

[0008] Die Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 53 und 56 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3, 41, 46, 50, 51, 54, 55 und 57-63.

[0009] Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz mittels einer einen Gegenstrang zu der Nukleinsäuresequenz erzeugenden Reaktion mit folgenden Schritten vorgesehen:

- a) Bereitstellen einer Verbindung gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz, wobei in der Verbindung ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz verhindert,
- b) Inkontaktingen der Verbindung mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz und einem zweiten für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen Primer,
- c) Durchführen der Reaktion, wobei sowohl der zweite Primer als auch die Verbindung mittels einer Polymerase-Reaktion modifiziert werden, so daß ein spezifisches Produkt gebildet wird, bestehend aus einem doppelsträngigen Bereich und der einzelsträngigen Identifizierungssequenz,
- d) Inkontaktingen der modifizierten Verbindung mit einer zu der Identifizierungssequenz zumindest teilweise komplementären an einem Träger immobilisierten Bindungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz spezifisch mit der Bindungssequenz hybridisiert und
- e) Nachweis der Hybridisierung der modifizierten Verbindung mit der Bindungssequenz.

[0010] Weiterhin ist ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz mittels einer einen Gegen-

strang zu der Nukleinsäuresequenz erzeugenden Reaktion mit folgenden Schritten vorgesehen:

- a) Bereitstellen einer Verbindung gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz,
- b) Inkontaktbringen der Verbindung mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz und einem zweiten für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen Primer,
- c) Durchführen der Reaktion, wobei sowohl der zweite Primer als auch die Verbindung mittels einer Polymerase-Reaktion modifiziert werden, und einer Abbaureaktion, so daß ein spezifisches Produkt gebildet wird, bestehend aus einem doppelsträngigen Bereich und einem zumindest aus einem Teil der Identifizierungssequenz oder zumindest aus einem Teil von deren Gegenstrang bestehenden einzelsträngigen Bereich,
- d) Inkontaktbringen des einzelsträngigen Bereichs mit einer dazu zumindest teilweise komplementären an einem Träger immobilisierten Bindungssequenz, wobei der einzelsträngige Bereich spezifisch mit der Bindungssequenz hybridisiert und
- e) Nachweis der Hybridisierung des einzelsträngigen Bereichs mit der Bindungssequenz.

[0011] Unter einem Primer wird ein durch eine Polymerase verlängerbares Oligonukleotid verstanden. Die Primer können aus DNA bestehen. Für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifische erste und zweite Primer sind Primer, welche unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen spezifisch mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder einem dazu komplementären Gegenstrang hybridisieren. Eine für den ersten Primer spezifische Identifizierungssequenz ist eine Identifizierungssequenz, die eindeutig dem ersten DNA-Primer zugeordnet ist. Das Mittel kann innerhalb der Identifizierungssequenz, innerhalb des ersten Primers oder zwischen dem ersten Primer und der Identifizierungssequenz enthalten sein.

[0012] Unter einem spezifischen Produkt wird ein Produkt verstanden, welches spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz ist. Damit ein solches Produkt gebildet wird müssen beim Schritt lit. c stringente Bedingungen gewählt werden.

[0013] Unter einer Abbaureaktion wird eine die Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang modifizierende Reaktion verstanden. Sie bewirkt eine Trennung der Identifizierungssequenz oder des Gegenstrangs vom jeweils nicht modifizierten komplementären Strang. Die Abbaureaktion kann eine nur einzelne Bindungen in der Identifizierungssequenz oder dem Gegenstrang spaltende Reaktion sein. Eine solche Reaktion kann zu einer Fragmentierung der Identifizierungssequenz oder des Gegenstrangs führen. Das Hybrid aus der Identifizierungssequenz und dem Gegenstrang wird dadurch thermodynamisch so destabilisiert, daß es spätestens unter den für Schritt lit. d erforderlichen stringenten Bedingungen dissoziiert.

[0014] Beim Schritt lit. d erfolgt das spezifische Hybridisieren der Identifizierungssequenz bzw. des einzelsträngigen Bereichs mit der Bindungssequenz unter geeigneten stringenten Bedingungen. Diese Bedingungen sind abhängig von den Sequenzen der Identifizierungssequenz bzw. des einzelsträngigen Bereichs und der Bindungssequenz. Die Ermittlung solcher Bedingungen ist dem Fachmann, z. B. aus der Ermittlung der Hybridisierungsbedingungen für PCR-Primer, bekannt.

[0015] Der Nachweis der Hybridisierung kann z. B. durch den Nachweis einer mit dem einzelsträngigen Bereich bzw. der modifizierten Verbindung verbundenen Markierungssubstanz erfolgen.

[0016] Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß das gebildete spezifische Produkt direkt mit der immobilisierten Bindungssequenz hybridisieren kann ohne zuvor denaturiert werden zu müssen. Weiterhin ist es bei dem Verfahren vorteilhaft, daß für die Reaktion einer Polymerase eingesetzt wird. Eine solche Reaktion ist spezifischer als eine Ligase-Reaktion. Weiterhin ist es vorteilhaft, daß ein Träger mit immobilisierten Bindungssequenzen mehrfach und zum Nachweis verschiedener Nukleinsäuresequenzen verwendet werden kann. Vorgegebene identische Identifizierungssequenzen können in verschiedenen Nachweisverfahren mit unterschiedlichen ersten Primern verbunden sein. Identische Bindungssequenzen können dann für den Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden.

[0017] Bei einem Verfahren mit einer Abbaureaktion ist es vorteilhaft, wenn die Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang mindestens eine Nukleotidsequenz aufweist, welche eine enzymatische Abbaureaktion erlaubt. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Identifizierungssequenz mindestens ein Nukleotid enthält oder in deren Gegenstrang mindestens ein Nukleotid eingebaut wird, welches eine Abbaureaktion ermöglicht. Das Nukleotid kann ein Desoxy-Uridin-Rest, ein Bromdesoxy-Uridin-Rest oder ein α -Thio-Desoxy-Nukleotid-Rest sein. Die Abbaureaktion kann mittels Uracil-DNA-Glycosylase, unter Lichteinwirkung oder mittels einer die Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang spaltenden Restriktionsendonuklease, insbesondere BsrI, BstNI, BsmAI, BsiI, BsoBI oder BstOI, durchgeführt werden.

[0018] Die Reaktion kann eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sein. Der erste Primer ist bevorzugt an seinen 5'-terminalen Bereich, insbesondere seinem 5'-Ende, mit der Identifizierungssequenz verbunden. Das erleichtert ein Modifizieren durch die Polymerase-Reaktion. Zum Bereitstellen der Verbindung können der erste Primer und die Identifizierungssequenz mittels einer, insbesondere das Mittel bildenden, Kopplungsgruppe verbunden werden. Dazu kann der erste Primer oder die Identifizierungssequenz eine aktivierte Kopplungsgruppe aufweisen. Das Mittel kann ein zum Abbruch der Polymerase-Reaktion führendes Mittel sein. Vorzugsweise besteht das Mittel aus mindestens einem Nukleotidanalogen, RNA, PNA oder einer Unterbrechung der Abfolge der die Nukleotide in der Verbindung verbindenden Phosphodiesterbindungen, insbesondere durch einen Polyethylenglycol-Linker, eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung. In einem Ausführungsbeispiel wird Schritt lit. c in Kontakt mit der immobilisierten Bindungssequenz durchgeführt. Das hat den Vorteil, daß sich der einzelsträngige Bereich sofort nach dem Entstehen in Kontakt mit der Bindungssequenz befindet und Schritt lit. d somit keinen zusätzlichen Arbeitsschritt erfordert. Das Hybridisieren des einzelsträngigen Bereichs mit der Bindungssequenz kann während der Durchführung des Schritts lit. c verfolgt werden. Das ermöglicht auch ein Quantifizieren der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz.

[0019] Beim Schritt lit. d kann das Produkt oder ein Fragment des Produkts, bestehend aus zumindest einem Teil des Gegenstrangs der Identifizierungssequenz oder aus zumindest einem Teil des doppelsträngigen Bereichs und zumindest einem Teil der Identifizierungssequenz, mit der Bindungssequenz in Kontakt gebracht werden. Die Identifizierungssequenz und/oder die Bindungssequenz kann eine Nukleinsäure, ein Nukleinsäurederivat oder ein Analogon einer Nukleinsäure oder eines Nukleinsäurederivats, insbeson-

dere PNA, RNA oder modifizierte DNA, enthalten. Vorzugsweise weist die Identifizierungssequenz 5 bis 20 Basen auf.

[0020] Der Träger kann aus Glas oder aus Kunststoff bestehen. Bevorzugt liegt er in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vor. Die Bindungssequenz kann gerichtet und/oder über einen Linker an dem Träger immobilisiert sein. Vorteilhafterweise ist die Bindungssequenz an einer definierten Stelle des Trägers immobilisiert.

[0021] Ein Identifizieren der mit der Bindungssequenz hybridisierten modifizierten Verbindung oder des mit der Bindungssequenz hybridisierten einzelsträngigen Bereichs kann durch ein Lokalisieren der Hybridisierung auf dem Träger oder ein Identifizieren des Trägers erfolgen. Dadurch kann das Identifizieren sehr schnell und einfach durchgeführt werden. Liegt der Träger z. B. in Form einer Membran vor und ist die modifizierte Verbindung mittels eines Farbstoffs markiert, so kann das Identifizieren der mit der Bindungssequenz hybridisierten modifizierten Verbindung durch ein Lokalisieren des Farbstoffs auf der Membran erfolgen. Der Träger kann bis zu 1000 verschiedene Bindungssequenzen aufweisen.

[0022] Bei einer bevorzugten Ausgestaltung weist der zweite Primer oder ein mittels der Polymerase-Reaktion an den ersten oder den zweiten Primer angefügtes Nukleotid eine Markierungssubstanz auf. Die Markierungssubstanz kann eine optisch detektierbare Substanz, insbesondere ein Fluorophor oder ein Farbstoff, ein, insbesondere radioaktives, Isotop, ein Hapten, ein Partikel, eine mittels Plasmonresonanz detektierbare Substanz, ein Ligand, insbesondere Biotin, oder eine reduzierbare oder oxidierbare Substanz sein. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Fluorophor um FAM (5[6]-Carboxyfluorescein), JOE (6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein), ROX (5[6]-Carboxy-X-rhodamin) oder TAMRA (Carboxytetramethylrhodamin). Das Produkt kann mit einem doppelstrangspezifischen Interkalator, insbesondere dem von der Firma Molecular Probes, Inc. Eugene, OR 97402-0469, USA vertriebenen SYBR Green, markiert werden. Vorteilhafterweise wird beim Schritt lit. e die Markierungssubstanz oder der in das Produkt eingelagerte Interkalator detektiert.

[0023] Die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz kann eine DNA sein. Es kann sich dabei aber auch um eine RNA handeln, wobei die Verbindung beim Schritt lit. b zusätzlich mit einer Reversen Transkriptase in Kontakt gebracht wird und beim Schritt lit. c zusätzlich eine Reverse Transkription durchgeführt wird. Dabei kann beim Schritt lit. b zusätzlich ein dritter für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischer Primer zugesetzt werden, an welchen beim Schritt lit. c mittels der Reversen Transkriptase Nukleotide angefügt werden. Vorzugsweise liegt die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz doppelsträngig vor und wird vor oder beim Schritt lit. b aufgeschmolzen. Die nach Durchführung des Schritts lit. c ggf. neben der modifizierten Verbindung noch vorhandene nicht modifizierte Verbindung kann vor dem Schritt lit. d, insbesondere mittels Silica-Partikel, Glas-Partikel oder geeigneter Filter, entfernt werden. Zum Entfernen der nicht modifizierten Verbindung sind die im Stand der Technik zum unspezifischen Entfernen einzelsträngiger Oligonukleotide bekannten Verfahren geeignet. Das Entfernen der nicht modifizierten Verbindung verhindert ein Besetzen von Bindungssequenzen durch diese Verbindung. Es kann die Sensitivität des Verfahrens erhöhen. Vorzugsweise ist die auf dem Träger immobilisierte Menge der Bindungssequenz mindestens so groß wie die Menge der insgesamt bereitgestellten Verbindung. Die ggf. nach Schritt lit. c noch vorhandene nicht modifizierte Verbindung braucht dann

nicht entfernt zu werden, um die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen.

[0024] Der erste und der zweite Primer sind bevorzugt so ausgewählt, daß ein aus dem ersten Primer und der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz gebildetes Hybrid im wesentlichen dieselbe Schmelztemperatur aufweist wie ein aus dem zweiten Primer und dem Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz gebildetes Hybrid. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind der erste und der zweite Primer, die Identifizierungssequenz und die Bindungssequenz so gewählt, daß der Schmelzpunkt eines Hybrids aus der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz und dem ersten Primer oder eines Hybrids aus dem Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz und dem zweiten Primer mindestens 5°C, insbesondere 10°C, oberhalb des Schmelzpunkts eines Hybrids aus der Identifizierungssequenz und der Bindungssequenz oder aus dem Gegenstrang der Identifizierungssequenz und der Bindungssequenz liegt. Das ist insbesondere dann von Vorteil, wenn Schritt lit. c in Kontakt mit der immobilisierten Bindungssequenz durchgeführt wird. Dann kann durch eine entsprechende Temperaturregulierung Schritt lit. c durchgeführt werden, ohne durch eine Hybridisierung mit der Bindungssequenz negativ beeinflusst zu werden. Die Hybridisierung kann dann nach Durchführung des Schritts lit. c durch Abkühlen erreicht werden.

[0025] Wenn mehrere Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen werden sollen, können die Bindungssequenzen so gewählt sein, daß verschiedene aus den Identifizierungssequenzen und den Bindungssequenzen gebildete spezifische Hybride im wesentlichen identische Schmelztemperaturen aufweisen. Das hat den Vorteil, daß alle Hybridisierungen unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt werden können und somit der Nachweis vieler Nukleinsäuresequenzen in einem Arbeitsgang erleichtert wird. Die Identifizierungssequenzen, die Bindungssequenzen und die ersten, zweiten und ggf. dritten Primer sind vorzugsweise so gewählt, daß sie unter ihren jeweiligen stringenten Hybridisierungsbedingungen keine unspezifischen Hybride bilden. Wenn mehrere Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen werden sollen, ist es von Vorteil, wenn die ersten und zweiten Primer so gewählt sind, daß verschiedene aus den ersten Primern und den nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen und den zweiten Primern und den Gegensträngen der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen gebildete spezifische Hybride eine im wesentlichen identische Schmelztemperatur aufweisen. Die Reaktion kann dann für mehrere Nukleinsäuresequenzen unter identischen Bedingungen durchgeführt werden. Vorzugsweise sind die ersten und zweiten Primer so gewählt, daß beim Schritt lit. c Produkte gebildet werden, welche im wesentlichen gleich lang sind. Die Produkte werden dann in ähnlichen Mengen gebildet und verhalten sich thermodynamisch nahezu identisch. Das trägt zur Vereinheitlichung der Verfahrensbedingungen bei.

[0026] Bei einem Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen kann/können der erste Primer und/oder die Identifizierungssequenz für mehrere den nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen spezifisch sein. Jeweils einer der zweiten Primer ist dabei für eine der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen spezifisch und weist eine für diesen zweiten Primer spezifische Markierungssubstanz auf. Beim Schritt lit. e erfolgt zusätzlich ein Identifizieren der spezifischen Markierungssubstanzen. Die Markierungssubstanzen müssen deutlich voneinander unterscheidbar sein.

[0027] Bei einem Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen können die Schritte lit. a, b und c mit verschiedenen nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen getrennt voneinander unter Verwendung unterscheidbarer

Markierungssubstanzen und/oder Interkalatoren und die Schritte lit. d und e gemeinsam durchgeführt werden. Beim Schritt lit. e erfolgt dann zusätzlich ein Identifizieren der Markierungssubstanzen und/oder Interkalatoren.

[0028] Erfindungsgemäß ist weiterhin eine Verwendung einer Identifizierungssequenz vorgesehen, wobei die Identifizierungssequenz mindestens ein eine Synthese eines Gegenstrangs der Identifizierungssequenz verhandelndes Mittel enthält oder wobei die Identifizierungssequenz Nukleotide und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben. Ferner ist eine Verwendung eines eine aktivierte Kopplungsgruppe aufweisenden ersten Primers oder einer eine aktivierte Kopplungsgruppe aufweisenden Identifizierungssequenz vorgesehen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer aus einem ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz gebildeten Verbindung, wobei in der Verbindung ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz verhindert oder wobei die Identifizierungssequenz Nukleotide und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben.

[0029] Ferner ist die Verwendung eines zweiten Primers in einem erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen. Dabei kann der zweite Primer eine Markierungssubstanz aufweisen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von mit einer Markierungssubstanz versehenen Nukleotiden bei der Reaktion. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung eines doppelstrangspezifischen Interkalators, insbesondere SYBR Green, zum Markieren des Produkts. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines mindestens eine immobilisierte Bindungssequenz aufweisenden Trägers. Die Bindungssequenz kann an einer definierten Stelle des Trägers immobilisiert sein. Der Träger kann auch ein identifizierbarer Träger sein. Der Träger kann aus Glas oder Kunststoff bestehen und/oder in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vorliegen. Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer Polymerase und/oder einer Reversen Transkriptase. Es versteht sich, daß auch eine analog zu den verfahrensseitigen Ausführungsbeispielen der Erfindung ausgestaltete Verwendungen erfindungsgemäß ist.

[0030] Weiterhin ist ein Kit zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, enthaltend:

- a) eine an einem Träger immobilisierte Bindungssequenz und
- b1) eine zu der Bindungssequenz zumindest teilweise komplementäre Identifizierungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz ein Mittel aufweist, welches nach einer Kopplung eines ersten Primers und der Identifizierungssequenz bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz verhindert oder
- b2) eine Identifizierungssequenz, welche selbst oder deren bei der Reaktion synthetisierbarer Gegenstrang zumindest teilweise komplementär zu der Bindungssequenz ist, wobei die Identifizierungssequenz Nukleotide und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben.

[0031] Die Identifizierungssequenz kann eine aktivierte Kopplungsgruppe zur Kopplung des 5'-terminalen Bereichs, insbesondere des 5'-Endes, des ersten Primers aufweisen. In dem Kit kann ein erster Primer enthalten sein, wobei entweder die Identifizierungssequenz oder der erste Primer eine aktivierte Kopplungsgruppe zur Kopplung des 5'-terminalen Bereichs, insbesondere des 5'-Endes, des ersten Primers auf-

weist.

[0032] Weiterhin ist ein Kit vorgesehen, enthaltend:

- a) eine an einem Träger immobilisierte Bindungssequenz und
- b1) eine Verbindung, gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen zu der Bindungssequenz zumindest teilweise komplementären Identifizierungssequenz, wobei in der Verbindung ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz verhindert oder
- b2) eine Verbindung, gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz, wobei die Identifizierungssequenz Nukleotide und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben und wobei die Identifizierungssequenz oder deren bei der Reaktion synthetisierbarer Gegenstrang zumindest teilweise komplementär zu der Bindungssequenz ist.

[0033] Bevorzugt ist die Bindungssequenz an einer definierten Stelle des Trägers immobilisiert. Der Träger kann auch ein identifizierbarer Träger sein. Vorteilhafterweise besteht der Träger aus Glas oder Kunststoff und/oder liegt in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vor. Das Mittel kann aus mindestens einem Nukleotidanalogon, RNA, PNA oder einer Unterbrechung der Abfolge der die Nukleotide in der Verbindung verbindenden Phosphodiesterbindungen, insbesondere durch einen Polyethylenglycol-Liner, eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung, bestehen. In dem Kit kann eine Polymerase und ggf. eine Reverse Transkriptase enthalten sein. Darüber hinaus kann ein, insbesondere eine Markierungssubstanz aufweisender, zweiter Primer enthalten sein. Der Kit kann auch mit einer Markierungssubstanz versehene Nukleotide enthalten. Ferner kann ein doppelstrangspezifischer Interkalator, insbesondere SYBR Green, enthalten sein. Es versteht sich, daß auch ein analog zu den verfahrensseitigen Ausführungsbeispielen der Erfindung ausgestalteter Kit erfindungsgemäß ist.

[0034] Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung beschrieben. Hierin zeigen:

[0035] Fig. 1a, b eine schematische Darstellung der Vervielfältigung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz mittels einer PCR,

[0036] Fig. 2a-c eine schematische Darstellung von auf einem Träger immobilisierten Bindungssequenzen und deren Hybridisierung mit einer Verbindung,

[0037] Fig. 3 eine schematische Darstellung der Vervielfältigung einer RNA mittels einer Reversen Transkriptase und einer DNA-Polymerase in einem Flußdiagramm und

[0038] Fig. 4 eine schematische Darstellung einer Vervielfältigung einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz mittels einer PCR und einer anschließenden Abbaureaktion.

[0039] In Fig. 1a ist eine aus einem ersten Primer 10 und einer Identifizierungssequenz 12 zusammengesetzte Verbindung 14 dargestellt. Der Primer 10 bindet an die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16. Der zweite Primer 18 weist eine Markierungssubstanz 20 auf. Er bindet an den Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16. In Fig. 1b ist schematisch das Ergebnis einer PCR gezeigt, die mit der in Fig. 1a dargestellten Verbindung 14, dem zweiten Primer 18 und der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16 durchgeführt worden ist. Die Identifizierungssequenz 12 enthält Mittel, die es verhindern, daß der Bereich der Identifizierungssequenz 12

fizierungssequenz 12 doppelsträngig wird. Es sind Produkte mit einem doppelsträngigen Bereich und der einzelsträngigen Identifizierungssequenz entstanden.

[0040] Fig. 2a zeigt einen Träger 22. Dabei kann es sich z. B. um eine Membran handeln. An dem Träger 22 sind über Linker 24 Bindungssequenzen 26 gebunden. In Fig. 2b ist die Situation nach dem Inkontaktbringen der in Fig. 2a dargestellten zu den Identifizierungssequenzen 12 komplementären Bindungssequenzen 26 mit den in Fig. 1b dargestellten PCR-Produkten gezeigt. Dabei binden die Identifizierungssequenzen 12 an die Bindungssequenzen 26. Durch die Markierungssubstanz 20 ist die Hybridisierung auf dem Träger 22 nachweisbar. Fig. 2c zeigt die Situation nach dem Inkontaktbringen der in Fig. 2a dargestellten Bindungssequenzen 26 mit nicht durch eine Polymerase-Reaktion modifizierten Verbindungen 14. Eine solche Situation entsteht, wenn die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16 nicht vorhanden ist. Die Identifizierungssequenzen 12 binden an die Bindungssequenzen 26. Eine Markierungssubstanz 20 ist am Ort der Hybridisierung nicht nachweisbar, weil kein der zweiten Primer 18 mit der Markierungssubstanz enthaltendes PCR-Produkt entstanden ist.

[0041] Fig. 3 zeigt schematisch ein Verfahren, bei dem die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz 16 eine RNA ist. Dabei bindet zunächst der die Markierungssubstanz 20 enthaltende zweite Primer 18 an die RNA. Er wird mittels einer Reversen Transkriptase verlängert. Dabei entsteht ein doppelsträngiges DNA-RNA-Hybrid. Nach einer Denaturierung des DNA-RNA-Hybrids bindet der erste Primer 10 an den DNA-Strang. Zur Vervielfältigung des DNA-Strangs wird eine PCR durchgeführt.

[0042] Fig. 4 zeigt eine aus einem Primer 10 und einer Identifizierungssequenz 12 bestehende Verbindung 14. Die Identifizierungssequenz 12 weist Nukleotide 13 auf, die durch eine Abbaureaktion modifizierbar sind. Eine PCR-Reaktion mit dieser Verbindung, einer nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz 16 und einem zweiten Primer 18 führt zu vollständig doppelsträngigen PCR-Produkten. Die darin enthaltenen Identifizierungssequenzen werden durch eine Abbaureaktion entfernt. Es entstehen doppelsträngige Produkte mit einem einzelsträngigen Gegenstrang der Identifizierungssequenz.

Bezugszeichenliste

10 erster Primer	45
12 Identifizierungssequenz	
13 modifizierbares Nukleotid	
14 Verbindung	
16 Nukleinsäuresequenz	50
18 zweiter Primer	
20 Markierungssubstanz	
22 Träger	
24 Linker	
26 Bindungssequenz	55

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz (16) mittels einer einen Gegenstrang zu der Nukleinsäuresequenz (16) erzeugenden Reaktion mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen einer Verbindung (14) gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen ersten Primer (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen Identifizierungssequenz (12), wobei in der Verbindung (14) ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Re-

aktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz (12) verhindert,

b) Inkontaktbringen der Verbindung (14) mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) und einem zweiten für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen Primer (18),

c) Durchführen der Reaktion, wobei sowohl der zweite Primer (18) als auch die Verbindung (14) mittels einer Polymerase-Reaktion modifiziert werden, so daß ein spezifisches Produkt gebildet wird, bestehend aus einem doppelsträngigen Bereich und der einzelsträngigen Identifizierungssequenz (12),

d) Inkontaktbringen der modifizierten Verbindung (14) mit einer zu der Identifizierungssequenz (12) zumindest teilweise komplementären an einem Träger (22) immobilisierten Bindungssequenz (26), wobei die Identifizierungssequenz (12) spezifisch mit der Bindungssequenz (26) hybridisiert und

e) Nachweis der Hybridisierung der modifizierten Verbindung (14) mit der Bindungssequenz (26).

2. Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäuresequenz (16) mittels einer einen Gegenstrang zu der Nukleinsäuresequenz (16) erzeugenden Reaktion mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen einer Verbindung (14) gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen ersten Primer (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen Identifizierungssequenz (12),

b) Inkontaktbringen der Verbindung (14) mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) und einem zweiten für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen Primer (18)

c) Durchführen der Reaktion, wobei sowohl der zweite Primer (18) als auch die Verbindung (14) mittels einer Polymerase-Reaktion modifiziert werden, und einer Abbaureaktion, so daß ein spezifisches Produkt gebildet wird, bestehend aus einem doppelsträngigen Bereich und einem zumindest aus einem Teil der Identifizierungssequenz (12) oder zumindest aus einem Teil von deren Gegenstrang bestehenden einzelsträngigen Bereich, d) Inkontaktbringen des einzelsträngigen Bereichs mit einer dazu zumindest teilweise komplementären an einem Träger (22) immobilisierten Bindungssequenz (26), wobei der einzelsträngige Bereich spezifisch mit der Bindungssequenz (26) hybridisiert und

e) Nachweis der Hybridisierung des einzelsträngigen Bereichs mit der Bindungssequenz (26).

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Identifizierungssequenz (12) oder deren Gegenstrang mindestens eine Nukleotidsequenz aufweist, welche eine enzymatische Abbaureaktion erlaubt.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Identifizierungssequenz (12) mindestens ein Nukleotid (13) enthält oder in deren Gegenstrang mindestens ein Nukleotid (13) eingebaut wird, welches eine Abbaureaktion ermöglicht.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Nukleotid (13) ein Desoxy-Uridin-Rest, ein Bromdesoxy-Uridin-Rest oder ein α -Thio-Desoxy-Nukleotid-Rest ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-5, wobei die Abbaureaktion mittels Uracil-DNA-Glycosylase, unter Lichteinwirkung oder mittels einer die Identifi-

zierungssequenz (12) oder deren Gegenstrang spaltenden Restriktionsendonuklease, insbesondere BsrI, BstNI, BsmAI, BstII, BsoBI oder BstOI, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste Primer (10) an seinem 5'-terminalen Bereich, insbesondere seinem 5'-Ende, mit der Identifizierungssequenz (12) verbunden ist.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Bereitstellen der Verbindung (14) der erste Primer (10) und die Identifizierungssequenz (12) mittels einer, insbesondere das Mittel bildenden, Kopplungsgruppe verbunden werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der erste Primer (10) oder die Identifizierungssequenz (12) eine aktivierte Kopplungsgruppe aufweist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel ein zum Abbruch der Polymerase-Reaktion führendes Mittel ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel mindestens aus einem Nukleotidanalogen, RNA, PNA oder einer Unterbrechung der Abfolge der die Nukleotide in der Verbindung (14) verbindenden Phosphodiesterbindungen, insbesondere durch einen Polyethylenglycol-Linker, eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung, besteht.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Schritt lit. c in Kontakt mit der immobilisierten Bindungssequenz (26) durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim Schritt lit. d das Produkt oder ein Fragment des Produkts, bestehend aus zumindest einem Teil des Gegenstrangs der Identifizierungssequenz (12) oder aus zumindest einem Teil des doppelsträngigen Bereichs und zumindest einem Teil der Identifizierungssequenz (12), mit der Bindungssequenz (26) in Kontakt gebracht wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenz (12) und/oder die Bindungssequenz (26) eine Nukleinsäure, ein Nukleinsäurederivat oder ein Analogon einer Nukleinsäure oder eines Nukleinsäurederivats, insbesondere PNA, RNA oder modifizierte DNA, enthält.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenz (12) 5 bis 20 Basen aufweist.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Träger (22) aus Glas oder Kunststoff besteht.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Träger (22) in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vorliegt.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenz (26) gerichtet und/oder über einen Linker (24) an dem Träger (22) immobilisiert ist.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindungssequenz (26) an einer definierten Stelle des Trägers (22) immobilisiert ist.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Identifizieren der mit der Bindungssequenz (26) hybridisierten modifizierten Verbindung (14) oder des mit der Bindungssequenz (26) hybridisierten einzelsträngigen Bereichs durch ein Lokalisie-

ren der Hybridisierung auf dem Träger (22) oder ein Identifizieren des Trägers (22) erfolgt.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Träger (22) bis zu 1000 verschiedene Bindungssequenzen (26) aufweist.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der zweite Primer (18) oder ein mittels der Polymerase-Reaktion an den ersten (10) oder den zweiten Primer (18) angefügtes Nukleotid eine Markierungssubstanz (20) aufweist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Markierungssubstanz (20) eine optisch detektierbare Substanz, insbesondere ein Fluorophor oder ein Farbstoff, ein, insbesondere radioaktives, Isotop, ein Hapten, ein Partikel, eine mittels Plasmonresonanz detektierbare Substanz, ein Ligand, insbesondere Biotin, oder eine reduzierbare oder oxidierbare Substanz ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Fluorophor FAM (5[6]-Carboxyfluorescein), JOE (6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein), ROX (5[6]-Carboxy-X-rhodamin) oder TAMRA (Carboxytetramethylrhodamin) ist.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Produkt mit einem doppelstrang-spezifischen Interkalator, insbesondere SYBR Green, markiert wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim Schritt lit. e die Markierungssubstanz (20) oder der in das Produkt eingelagerte Interkalator detektiert wird.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) eine DNA ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-27, wobei die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) eine RNA ist, die Verbindung (14) beim Schritt lit. b zusätzlich mit einer Reversen Transkriptase in Kontakt gebracht wird und beim Schritt lit. c zusätzliche eine Reverse Transkription durchgeführt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei beim Schritt lit. b zusätzlich ein dritter für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischer Primer zugesetzt wird, an welchen beim Schritt lit. c mittels der Reversen Transkriptase Nukleotide angefügt werden.

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) doppelsträngig vorliegt und vor oder beim Schritt lit. b aufgeschmolzen wird.

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die nach Durchführung des Schritts lit. c ggf. neben der modifizierten Verbindung (14) noch vorhandene nicht modifizierte Verbindung (14) vor dem Schritt lit. d, insbesondere mittels Silica-Partikel, Glas-Partikel oder geeigneter Filter, entfernt wird.

33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die auf dem Träger (22) immobilisierte Menge der Bindungssequenz (26) mindestens so groß ist wie die Menge der insgesamt bereitgestellten Verbindung (14).

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste (10) und der zweite Primer (18) so ausgewählt sind, daß ein aus dem ersten Primer (10) und der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) gebildetes Hybrid im wesentlichen dieselbe Schmelztemperatur aufweist wie ein aus dem zweiten Primer (18) und dem Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) gebildetes Hybrid.

35. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-

sprüche, wobei der erste (10) und der zweite Primer (18), die Identifizierungssequenz (12) und die Bindungssequenz (26) so gewählt sind, daß der Schmelzpunkt eines Hybrids aus der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) und dem ersten Primer (10) oder eines Hybrids aus dem Gegenstrang der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz (16) und dem zweiten Primer (18) mindestens 5°C, insbesondere 10°C, oberhalb des Schmelzpunkts eines Hybrids aus der Identifizierungssequenz (12) und der Bindungssequenz (26) oder aus dem Gegenstrang der Identifizierungssequenz (12) und der Bindungssequenz (26) liegt.

36. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenzen (12) und die Bindungssequenzen (26) so gewählt sind, daß verschiedene aus den Identifizierungssequenzen (12) und den Bindungssequenzen (26) gebildete spezifische Hybride im wesentlichen identische Schmelztemperaturen aufweisen.

37. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Identifizierungssequenzen (12), die Bindungssequenzen (26) und die ersten (10), zweiten (18) und ggf. dritten Primer so gewählt sind, daß sie unter ihren jeweiligen stringenten Hybridisierungsbedingungen keine unspezifischen Hybride bilden.

38. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten (10) und zweiten Primer (18) so gewählt sind, daß verschiedene aus den ersten Primern (10) und den nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen (16) und den zweiten Primern (18) und den Gegensträngen der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen (16) gebildete spezifische Hybride eine im wesentlichen identische Schmelztemperatur aufweisen.

39. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten (10) und zweiten Primer (18) so gewählt sind, daß beim Schritt lit. c Produkte gebildet werden, welche im wesentlichen gleich lang sind.

40. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste Primer (10) und/oder die Identifizierungssequenz (12) für mehrere der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen (16) spezifisch ist/sind und jeweils einer der zweiten Primer (18) für eine der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen (16) spezifisch ist und eine für diesen zweiten Primer (18) spezifische Markierungssubstanz (20) aufweist, wobei beim Schritt lit. e zusätzlich ein Identifizieren der spezifischen Markierungssubstanzen (20) erfolgt.

41. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen (16) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Schritte lit. a, b und c mit verschiedenen nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen (16) getrennt voneinander unter Verwendung unterscheidbarer Markierungssubstanzen (20) und/oder Interkalatoren und die Schritte lit. d und e gemeinsam durchgeführt werden, wobei beim Schritt lit. e zusätzlich ein Identifizieren der Markierungssubstanzen (20) und/oder Interkalatoren erfolgt.

42. Verwendung einer Identifizierungssequenz (12) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41, wobei die Identifizierungssequenz (12) mindestens eine Synthese eines Gegenstrangs der Identifizierungssequenz (12) verhinderndes Mittel enthält oder wobei

die Identifizierungssequenz (12) Nukleotide (13) und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben.

43. Verwendung einer aktivierten Kopplungsgruppe aufweisenden ersten Primers (10) oder einer aktivierten Kopplungsgruppe aufweisenden Identifizierungssequenz (12) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

44. Verwendung einer aus einem ersten Primer (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen Identifizierungssequenz (12) gebildeten Verbindung (14) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41, wobei in der Verbindung (14) ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz (12) verhindert oder wobei die Identifizierungssequenz (12) Nukleotide (13) und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben.

45. Verwendung eines zweiten Primers (18) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

46. Verwendung nach Anspruch 45, wobei der zweite Primer (18) eine Markierungssubstanz (20) aufweist.

47. Verwendung von mit einer Markierungssubstanz (20) versehenen Nukleotiden bei der Reaktion in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

48. Verwendung eines doppelstrangspezifischen Interkalators, insbesondere SYBR Green, zum Markieren des Produkts in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

49. Verwendung einer mindestens eine immobilisierte Bindungssequenz (26) aufweisenden Trägers (22) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

50. Verwendung nach Anspruch 49, wobei die Bindungssequenz (26) an einer definierten Stelle des Trägers (22) immobilisiert ist oder der Träger (22) ein identifizierbarer Träger (22) ist.

51. Verwendung nach Anspruch 49 oder 50, wobei der Träger (22) aus Glas oder Kunststoff besteht und/oder in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vorliegt.

52. Verwendung einer Polymerase und/oder einer Reversen Transkriptase in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-41.

53. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-41, enthaltend:

a) eine an einem Träger (22) immobilisierte Bindungssequenz (26) und

b1) eine zu der Bindungssequenz (26) zumindest teilweise komplementäre Identifizierungssequenz (12), wobei die Identifizierungssequenz (12) ein Mittel aufweist, welches nach einer Kopplung eines ersten Primers (10) und der Identifizierungssequenz (12) bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz (12) verhindert oder

b2) eine Identifizierungssequenz (12), welche selbst oder deren bei der Reaktion synthetisierbarer Gegenstrang zumindest teilweise komplementär zu der Bindungssequenz (26) ist, wobei die Identifizierungssequenz (12) Nukleotide (13) und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben.

54. Kit nach Anspruch 53, wobei die Identifizierungssequenz (12) eine aktivierte Kopplungsgruppe zur Kopplung des 5'-terminalen Bereichs, insbesondere des 5'-Endes, des ersten Primers (10) aufweist.

55. Kit nach Anspruch 53, wobei ein erster Primer (10) enthalten ist und entweder die Identifizierungs-

quenz (12) oder der erste Primer (10) eine aktivierte Kopplungsgruppe zur Kopplung des 5'-terminalen Bereichs, insbesondere des 5'-Endes, des ersten Primers (10) aufweist.

56. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 41, enthaltend:

- a) eine an einem Träger (22) immobilisierte Bindungssequenz (26) und
- b1) eine Verbindung (14), gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen ersten Primer (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen zu der Bindungssequenz (26) zumindest teilweise komplementären Identifizierungssequenz (12), wobei in der Verbindung (14) ein Mittel vorgesehen ist, welches bei der Reaktion eine Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz (12) verhindert oder
- b2) eine Verbindung (14), gebildet aus einem für die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz (16) spezifischen ersten Primer (10) und einer für den ersten Primer (10) spezifischen Identifizierungssequenz (12), wobei die Identifizierungssequenz (12) Nukleotide (13) und/oder eine Nukleotidsequenz enthält, welche eine Abbaureaktion erlaubt/erlauben und wobei die Identifizierungssequenz (12) oder deren bei der Reaktion synthetisierbarer Gegenstrang zumindest teilweise komplementär zu der Bindungssequenz (26) ist.

57. Kit nach einem der Ansprüche 53–56, Wobei die Bindungssequenz (26) an einer definierten Stelle des Trägers (22) immobilisiert ist oder der Träger (22) ein identifizierbarer Träger (22) ist.

58. Kit nach einem der Ansprüche 53–57, wobei der Träger (22) aus Glas oder Kunststoff besteht und/oder in Form eines identifizierbaren Partikels, einer Membran oder eines Chips vorliegt.

59. Kit nach einem der Ansprüche 53–58, wobei das Mittel aus mindestens einen Nukleotidanalogen, RNA, PNA oder einer Unterbrechung der Abfolge der die Nukleotide in der Verbindung (14) verbindenden Phosphodiesterbindungen, insbesondere durch einen Polyethylenglycol-Linker, eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung, besteht.

60. Kit nach einem der Ansprüche 53–59, wobei eine Polymerase und ggf. eine Reverse Transkriptase enthalten ist/sind.

61. Kit nach einem der Ansprüche 53–60, wobei ein, insbesondere eine Markierungssubstanz (20) aufweisender, zweiter Primer (18) enthalten ist.

62. Kit nach einem der Ansprüche 53–61, wobei mit einer Markierungssubstanz (20) versehene Nukleotide enthalten sind.

63. Kit nach einem der Ansprüche 53–62, wobei ein doppelstrangspezifischer Interkalator, insbesondere SYBR Green, enthalten ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

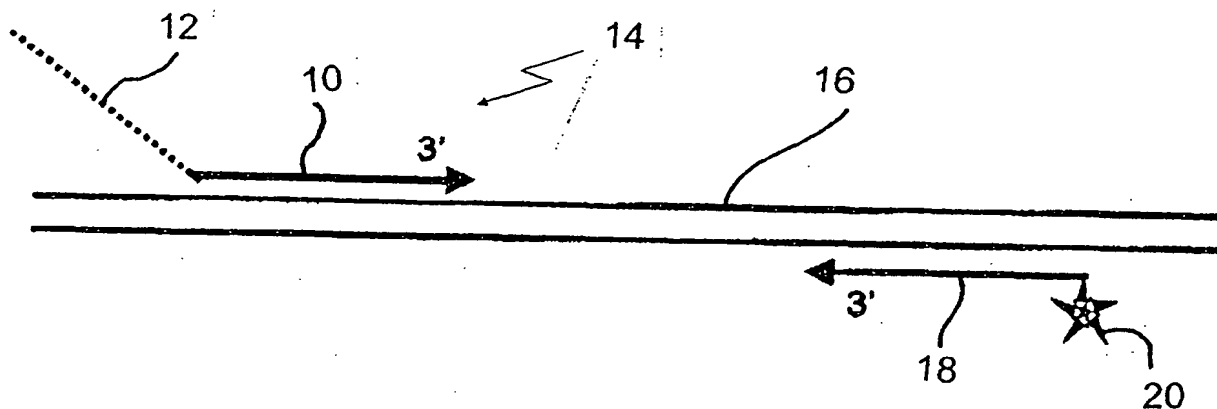


Fig. 1a

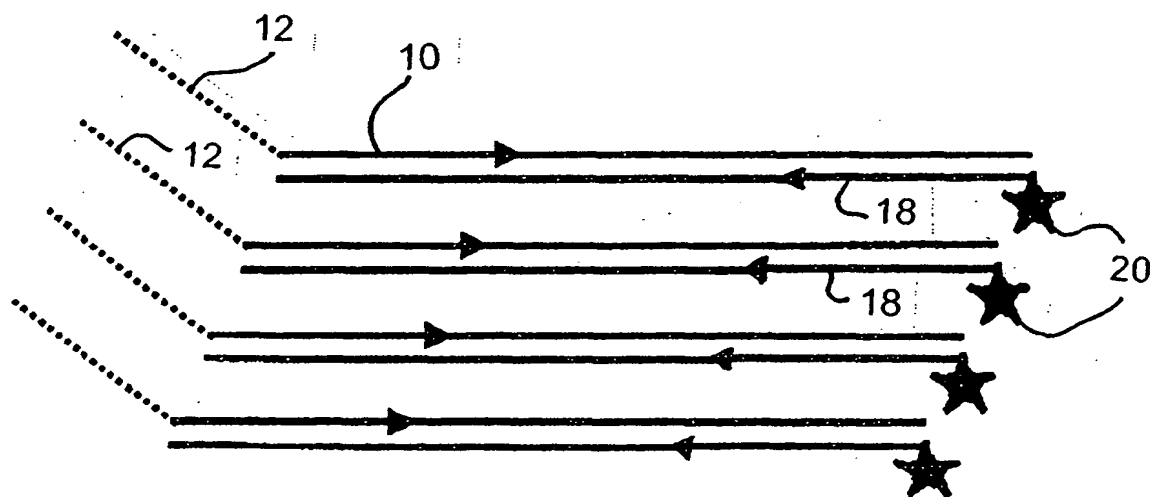


Fig. 1b

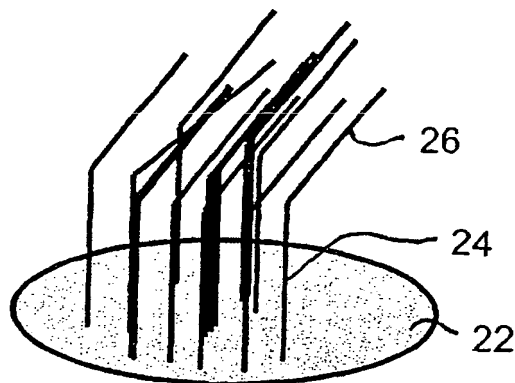


Fig. 2a

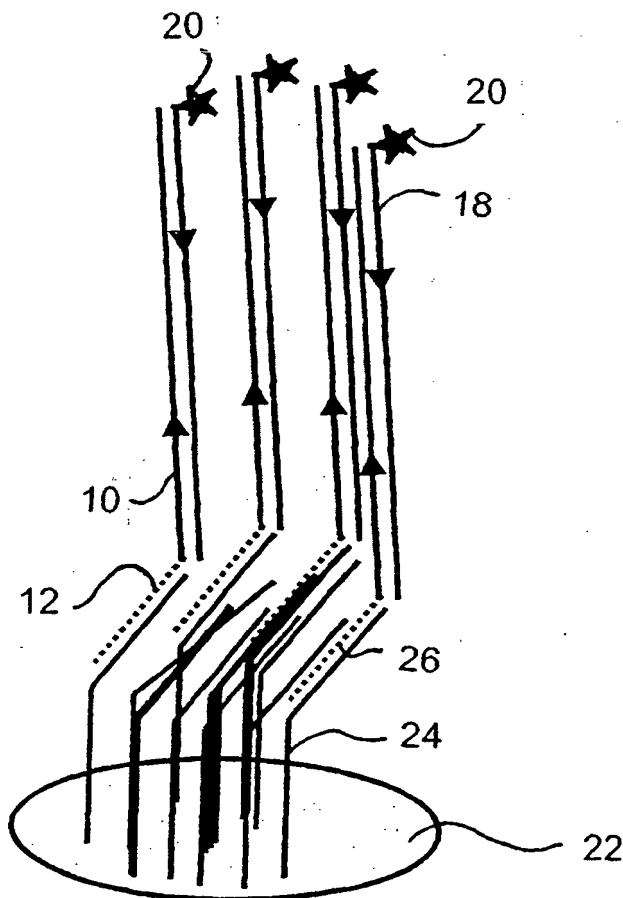


Fig. 2b

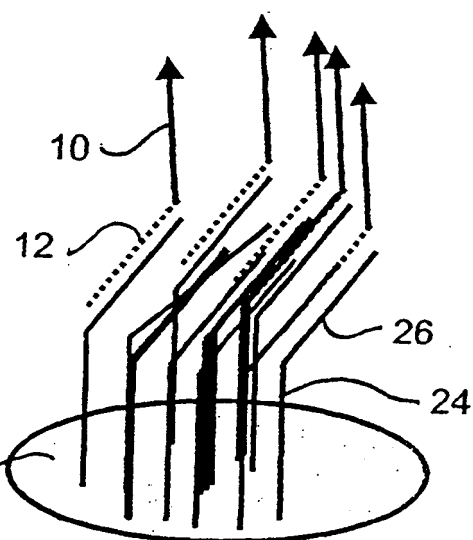


Fig. 2c

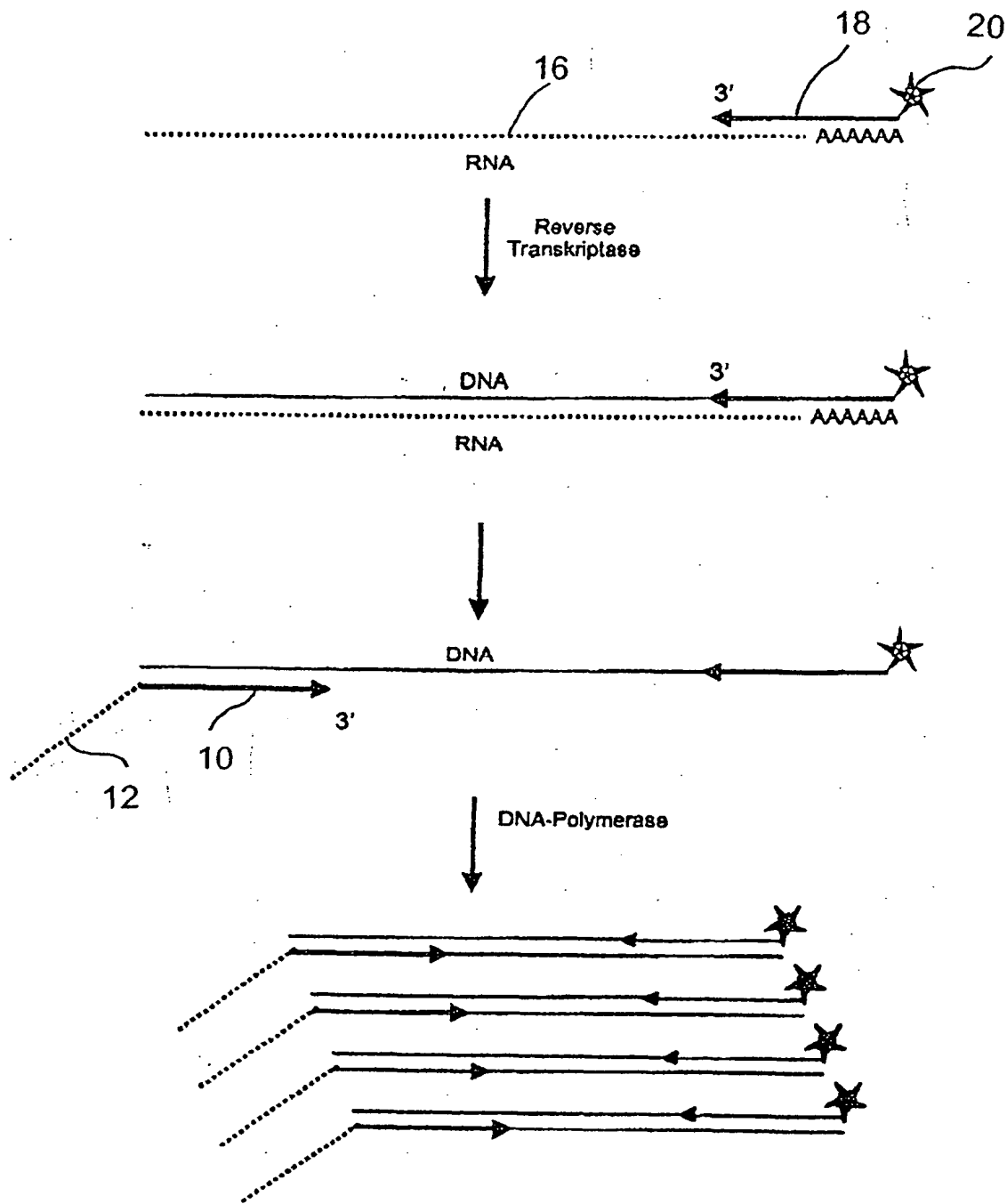


Fig. 3

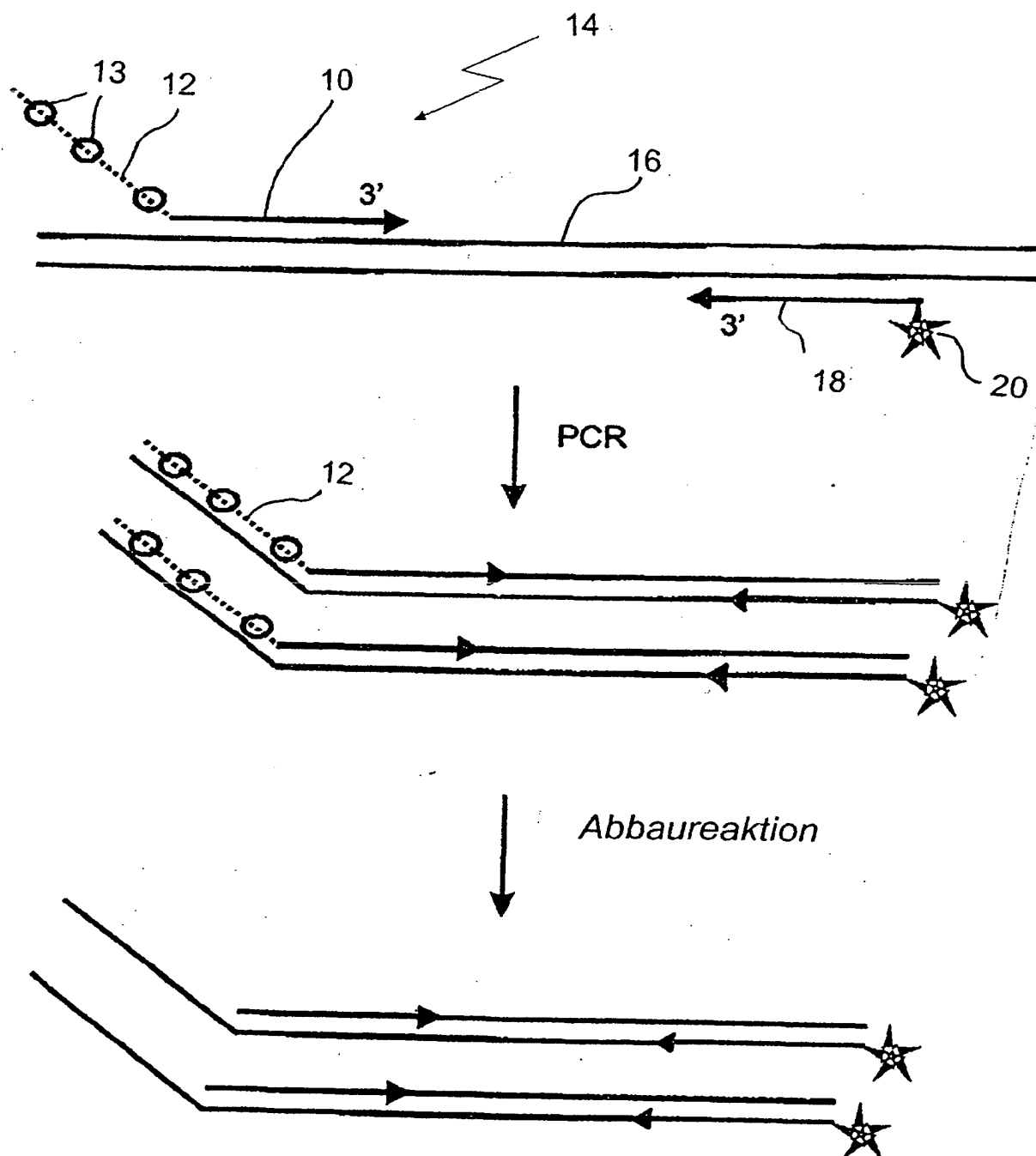


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)